

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570105

研究課題名(和文) 巨大古代湖は最上川水系の魚類のレフュージアだったのか？

研究課題名(英文) Were huge ancient lakes refugia for fishes distributed in Mogami River System ?

研究代表者

半澤 直人 (Hanzawa, Naoto)

山形大学・理学部・教授

研究者番号：40292411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： 約600万年前から400万年前にかけて上・下流側に2つの巨大淡水湖があったとされる最上川水系周辺で、独自の進化を遂げた可能性のある魚類の集団解析を行い、古代湖が進化に及ぼした影響について考察した。調べた7種のうち、2種は固有の新規分類群と見られ、古代湖周辺で分化が進んだことが示唆された。別の3種では、最上川と近隣水系間、最上川の上・下流の集団間で異なる遺伝的構造が認められ、古代湖に流入する異なる河川水系間での地理的隔離の影響が示唆された。他の2種では特徴的な集団構造は認められなかった。比較対象とした相模川水系では、他水系からの移入個体の影響が大き過ぎて、明確な集団解析はできなかった。

研究成果の概要(英文)： The recent geological data suggests that two huge lakes had developed around the upper and lower reaches of recent Mogami River System during 4 - 6 million years ago. We conducted population genetic analyses of seven fishes that might be evolved around the ancient lakes, and discussed the influence of ancient lakes for their evolution. Two of the seven species had been probably speciated around the ancient lakes. In other three species, genetic structures were different between Mogami and adjacent river populations or between the upper and lower reach populations in Mogami River System, suggesting that geographical isolation by the ancient lakes had affected to their genetic differentiation. In other two species, distinctive genetic structures did not recognize between populations. In Sagami River populations to compare with Mogami River populations, clear genetic analyses could not do by remarkable introduction of individuals derived from different river systems.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：遺伝的集団構造 最上川水系 淡水魚類 古代湖 氷河期 レフュージア 人為的攪乱

### 1. 研究開始当初の背景

山形県内を流れる最上川水系は、日本でも有数の大河である。近年の地質学的研究(山形県立博物館, 1996, 山野井, 2009)によって、現在の山形県周辺は元々海底で、約 600 万年前に現在の置賜地方(米沢市周辺)に巨大淡水湖・置賜湖が、現在の最上地方(新庄市周辺)に新庄湾の巨大な干潟が発達していたとされる。さらに、約 400 万年前には新庄湾が巨大淡水湖・新庄湖となり、これら 2 つの淡水湖から最上川水系が形成されたと推定されている。日本でこのように古い年代から存続する湖沼は琵琶湖のみだが、琵琶湖では湖をレフュージアとして逃げ込んだ淡水生物が 4 回の厳しい氷河期を経て絶滅をまぬがれ、50 以上の固有種または固有亜種が分化したとされている。最上川水系周辺にも、琵琶湖に匹敵する古い年代から巨大淡水湖が発達し、現在でも大河が存続することから、魚類などの淡水生物が氷河期を経て固有進化している可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記のような最上川水系周辺の地史を考慮しながら、最上川水系周辺に分布する淡水魚類在来種を対象として、集団遺伝学的解析、または分子系統解析によって、これらに在来種の種分化、地域集団の分化がどのように起こったのかを明らかにして、古代湖や河川がそのような進化にどのように影響したかを考察するものである。そのため、新たに解析精度の高い DNA マーカーを開発して、特にサケ科、コイ科、ハゼ科、カジカ科の在来淡水魚類 7 種を材料として解析を行う。以上の解析を通して、最上川水系の魚類相形成史の一端を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、最上川水系に分布する在来種 7 種、シナイモツゴ、ジュズカケハゼ、イワナ、カジカ大卵型、ハナカジカ、アブラハヤ、ニゴイを研究対象とした。最上川水系と近隣の水系、および比較対象である相模川水系でこれらに在来種の分布を調査し、各調査地から 20 個体以上のサンプルを採集して解析に用いた。DNA マーカーとして、各種ミトコンドリア遺伝子、調節領域配列、マイクロサテライト DNA を用い、様々なプログラムを用いて分子系統解析、および集団遺伝学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)シナイモツゴ近似種

ミトコンドリア cyt b 遺伝子に基づいて、宮城県のシナイモツゴと日本海側集団、およびウシモツゴ、モツゴの間で分子系統解析を行った結果、宮城県のシナイモツゴと日本海側集団の遺伝的距離 p-distance は 0.045~0.049 を示し、別種であるモツゴとの間(0.101~0.122) ウシモツゴとの間(0.082

~0.091) に次いで、遺伝的に大きく分化していた。コイ科の他属種間の遺伝的分化の水準と比較すると、日本海側集団は奥羽山脈などによって数百万年前から宮城県のシナイモツゴとは地理的に隔離され、独自の進化を遂げてきたと考えられる。また、日本海側集団はおよそ山形市を境として、山形県北部・秋田県南部と山形県南部の二つの遺伝的に異なるグループに分けられた。これは、日本海側集団の祖先集団が、最上川水系の上流側と下流側にかつて発達していた 2 つの巨大淡水湖内でそれぞれ隔離されて遺伝的分化を遂げ、河川水系が形成された後も集団間の遺伝的分化の影響が残っている可能性が示唆された。なお、外部形態の比較解析で、日本海側集団の全個体は、宮城県のシナイモツゴに比べて、有意に吻長が長く眼径が小さかった。このように、日本海側集団は、形態的にも宮城県のシナイモツゴとは明らかに分化しており、日本海側の地域固有種と見なされた。また、マイクロサテライト DNA 多型に基づく解析では、日本海側シナイモツゴ集団とモツゴの交雑個体が見つかったが、全ての個体が日本海側集団の雌がモツゴの雄と交雑した雑種第 1 代が、第 2 代以降にモツゴと戻し交雑を重ねてきたことが推定された。

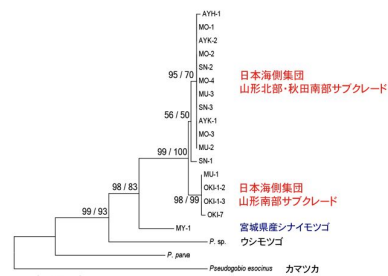


図1 cyt b 遺伝子に基づく宮城県産シナイモツゴ、日本海側集団間の近隣結合系統樹

#### (2)ジュズカケハゼ鳥海固有種

当初、鳥海山周辺地域で発見されたジュズカケハゼ近似種は、ミトコンドリア cyt b 遺伝子に基づく日本各地のジュズカケハゼ種群の分子系統解析によって、他の種群とは高度に遺伝的に分化し、雌の婚姻色などの形質も他の種群とは明らかにことなることから、分化を遂げた地域固有種であることが確認されている。さらに、このジュズカケハゼ鳥海固有種の分布を詳しく調べた結果、山形県庄内地方の池沼の他、新潟県中部まで不連続に分布していることが明らかとなったが、山形県内陸部や秋田県には分布していなかった。各地域集団の遺伝的多様性は著しく低く、山形県庄内地方の集団はそれぞれ遺伝子型が異なる北側と南側の 2 グループに明確に分けられた。以上より、ジュズカケハゼ鳥海固有種は種分化を遂げた後、現在の最上川下流域にかつて存在した淡水湖などに隔離され、さらに少数の個体が分布を広げる過程で創始者効果を受けて、遺伝的浮動により集団

の遺伝的分化が起こった可能性が示された。

### (3)イワナ

山形県内の河川水系と近隣の河川水系の上流部でイワナ在来集団の分布調査と集団遺伝学的解析を行った。各水系、支流から1ヶ所20個体以上のサンプルを電気ショッカーによって採集し、脂鱗のみを採取して、生きた個体をそのまま放流した。採取した脂鱗からDNAを精製し、ミトコンドリアcyt b遺伝子に基づく集団遺伝学的解析を行った。その結果、最上川水系支流の多くの集団は東北地方の河川集団で見られる主要な遺伝子型を持つため、多くは在来個体から成る集団と見なされた。また、新潟県境に近い山形県内の河川水系の集団は、新潟以南の日本海側各地の河川集団で認められる主要な遺伝子型を持ち、山形県内の他の水系とは明らかに遺伝的に異なっていた。一方、最上地方の一部の最上川水系支流集団では、調べたほとんどの個体が琵琶湖周辺河川水系の遺伝子型を持つことが判明し、琵琶湖周辺河川の人口種苗がいくつかの種苗生産場を経由して運び込まれて放流された可能性が高いことが明らかとなった。このように人為的攪乱が起こっていた支流を除く最上川水系の集団には、上流側と下流側で明確な集団間の分化は認められず、イワナに関しては異なる巨大淡水湖に流入する河川水系などによる地理的隔離はなかったと推察された。

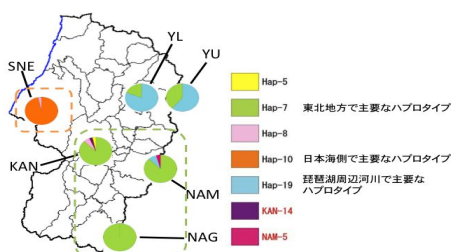


図2 最上川周辺河川水系のイワナ集団におけるcyt b 遺伝子ハプロタイプ組成

### (4)カジカ大卵型

山形県内の河川水系と近隣の河川水系で河川陸封型であるカジカ大卵型集団の解析を、ミトコンドリア調節領域配列とマイクロサテライトDNA多型に基づいて行った。その結果、調節領域配列多型に基づいて推定された最上川水系の各集団の遺伝的多様性は他の河川水系と有意な差はなく、同一の河川水系内の標本群も一つの集団としての挙動を強く示した。一方、マイクロサテライトDNAでは最上川水系の各標本群の遺伝的多様性は明らかに低く、また最上川水系集団は各地域・支流ごとに遺伝的構造が異なり、すでに分集団化していると思われた。これらの結果は、最上川全域に生息するカジカ大卵型では支流ごとに地理的隔離が成立し、それぞれが異なる生息場所で生活環をおくっていることを示唆しており、またミトコンドリア

DNAと核DNAの遺伝様式と分子進化速度の差を反映していると推察された。なお、マイクロサテライトDNA多型では、最上川水系の上流側と下流側の集団間で、集団構造が異なる傾向が認められ、カジカ大卵型の集団は、2つの古代湖に流入する河川水系によって地理的に隔離されていた名残が現在でも残っていることが示唆された。

### (5)ハナカジカ地域固有種

河川源流域や湧水を水源とする小河川に分布が限定されている河川陸封型のハナカジカを最上川水系各支流の源流域から採集し、ミトコンドリア調節領域とマイクロサテライトDNA多型に基づいて、集団遺伝学的解析を行った。本研究におけるミトコンドリア調節領域に基づく分子系統解析の結果は、山形産ハナカジカが北海道、東北のハナカジカとは大きく離れた系統に位置し、約150万年前に北海道、東北のハナカジカと分岐して独自の進化を遂げた地域固有種とする先行研究の結果(Goto et al., 2002)を強く支持した。最上川水系各支流の集団のハプロタイプ多様度、塩基多様度はともに0.000に近く、各集団の遺伝的多様性が失われている可能性が高かった。また、マイクロサテライトDNAに基づく解析では、同属の姉妹種であるカジカ大型卵で行われた先行研究の解析結果と比較すると、集団の遺伝的多様性の指標である対立遺伝子数、ヘテロ接合度はともに1/2以下である一方、集団間の遺伝的分化の指標であるFst値は、カジカ大型卵の2~10倍の値を示した。以上より、ハナカジカ地域固有種の集団は、カジカ大型卵集団より遺伝的多様性が極めて低く、集団間の分化がより大きく進んでいると考えられた。山形産ハナカジカ地域固有種の各集団では、極端に集団サイズが小さくなり、遺伝的多様性が低下した後、強い遺伝的浮動が働いて、支流集団ごとに遺伝的分化が進んだと推定された。なお、ミトコンドリアとマイクロサテライトのどちらの解析でも、最上川水系上流側と下流側の支流集団間で明らかに遺伝的集団構造が異なり、2つの古代湖に流入する異なる河川支流で地理的隔離されていた名残が、現在でも残っている可能性が示された。

### (6)アブラハヤ

最上川水系の比較対象として、相模川水系と隣接する水系で、ミトコンドリア調節領域多型に基づいて、アブラハヤの遺伝的集団構造を調べた。その結果、両水系の26地点152個体から20種類の遺伝子型が同定された。同定された20種類の遺伝子型を基に構築した最尤系統樹から、両水系に生息するアブラハヤ集団は少なくとも2つの創始者によって成立したと考えられた。この2つの創始者によるグループはネットワーク解析において、ネットワークXとYに分離するとともに、どちらのネットワークにも属さないHap14の3

グループとして認識された。遺伝子型を構成した個体の採集地点から、ネットワーク X は両水系に分布する集団であることが明らかになった。一方、ネットワーク Y は人為的に他水系から相模川水系へ導入された可能性が考えられた。ネットワーク Y に属する Hap4 はその分布状況から玉川の流路変更によって金目川水系から相模川水系に移入した外来個体の遺伝子型と考えられる。この Hap4 が両水系間の遺伝的分化に及ぼした影響を評価する目的で AMOVA を行った。その結果、Hap4 を解析に加えた場合と除外した場合で、水系間の遺伝的分化を示す  $F_{CT}$  の値が Hap4 有で 0.07、Hap4 無で 0.353 と除外した場合で増加した。このことは、玉川の流路変更により恩曾川に侵入したと考えられる Hap4 が水系間の遺伝的分化に影響を及ぼしていることを示唆する。本研究の結果から、隣接する水系を跨ぐ河川改修によって在来集団の遺伝的多様性に攪乱が起きている可能性が示された。以上のように、遺伝的集団構造は解析できたが、他の地域集団から移入した個体の影響が大き過ぎて、在来集団の集団構造は必ずしも明確ではなかった。

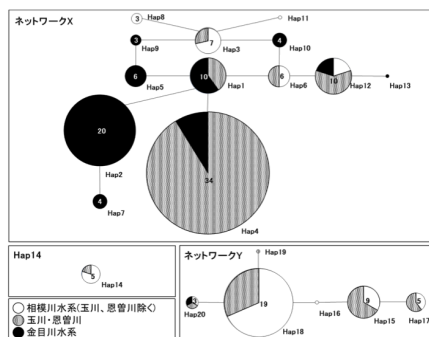


図7. 得られた20ハプロタイプから構築された最節約ネットワーク。白丸は玉川、恩曾川を除く相模川水系産個体が占める割合、斜線丸は玉川、恩曾川産個体が占める割合、黒丸は金目川水系産個体が占める割合を示し、円内の数字は個体数を示す。円内に数字がないものは1個体のみのものである。丸はそれぞれのネットワークの境界を示す。

### (7) ニゴイ

当初は最上川水系の上流から下流、太平洋側の分布の北限にあたる宮城県鳴瀬川水系と北上川水系、および比較対象としての神奈川県相模川水系でニゴイを採集し、ミトコンドリア調節領域多型に基づいて、遺伝的集団構造を調べた。その結果、最上川水系の上流から下流の集団では明確な集団構造の違いは検出されなかった。したがって、ニゴイについては最上川水系周辺にかつて存在した2つの巨大淡水湖とそこに流入する異なる河川水系などによる地理的隔離はなかったと推察された。

一方、相模川水系のニゴイは異なる2つの系統に分かれた。このうち1系統は東北地方のニゴイと同じ系統に含まれたが、もう一方は独立の系統でその由来は不明であった。そこで、日本の関東、関西、中国のいくつかの水系から広くニゴイ類を採集して、ミトコンドリア調節領域配列を検出し、さらに遺伝子データベースに登録されている中国本土・台湾産コウライニゴイのミトコンドリア調節

領域配列を検索して、合わせて分子系統解析を行った。なお、西日本に分布するニゴイ類は、その形態的特徴から中国本土・台湾産種と同種のコウライニゴイ(竹下・木村, 1990; 竹下ら, 1991)と同定されている。分子系統解析の結果、東日本産ニゴイと西日本産コウライニゴイはそれぞれ、中国本土・台湾産コウライニゴイとは明らかに異なる系統に位置し、それぞれの系統の分岐は98%、86%の高い信頼度で支持された。このように、東日本産ニゴイと西日本産コウライニゴイは、中国・台湾産コウライニゴイとは明らかに独立した系統に位置したが、種間の遺伝的分化の程度はそれほど大きくはなく、さらにその形態的差異も、個体によって必ずしも明確に異なっている訳ではなかった。以上より、東日本産ニゴイと西日本産コウライニゴイは、大陸・台湾産コウライニゴイとともに、再度形態的特徴を精査し、分類学的再検討を行う必要があると考えられた。

一方、相模川水系のニゴイ集団には、西日本産コウライニゴイの遺伝子型がかなり多く混じっていることが判明した。すなわち、相模川水系周辺には、琵琶湖産のアユやゲンゴロウブナの種苗放流が行われているので、これらの種苗個体に混じって、西日本産コウライニゴイが移植放流され、相模川水系在来のニゴイと交雑している可能性が示唆された。このことは、マイクロサテライト DNA 7 座位の解析データからも強く支持され、西日本産コウライニゴイの在来ニゴイへの浸透交雑が、かなり進んでいることが示唆された。

### 5. 主な発表論文等

#### 〔雑誌論文〕(計2件)

- Imoto, JM, Saitoh, K, Sasaki, T, Yonezawa, T, Adachi, J, Kartavtsev, YP, Miya, M, Nishida, M and Hanzawa N. Phylogeny and biogeography of highly diverged freshwater fish species (Leuciscinae, Cyprinidae, Teleostei) inferred from mitochondrial genome analysis. *Gene*, 査読有, Vol.514, 2013, pp.112-124  
DOI: 10.1016/j.gene.2012.10.19
- Gotoh, RO, Tamate, S, Yokoyama, J, Tamate, HB and Hanzawa, N. Characterization of comparative genome-derived simple sequence repeats for acanthopterygian fishes. *Molecular Ecology Resources*, 査読有, Vol.13, 2013, pp.461-472  
DOI: 10.1111/1755-0998.12070

#### 〔学会発表〕(計12件)

- 大井章豊・井元順一・Y. P. Kartavtsev・足立淳・半澤直人・佐々木剛・核遺伝子解析による極東産ウグイ亜科魚類の系統進

化．第13回日本進化学会．2011年7月30日～31日．京都．  
千葉悟・渋川浩一・向井貴彦・半澤直人．  
ジュズカケハゼ種群の分布と遺伝的多様性．2011年度日本魚類学会年会．2011年9月29日～10月2日．弘前．  
井元順一・斉藤憲治・佐々木剛・足立淳・Kartavtsev, Y. P.・宮正樹・西田睦・半澤直人．ミトゲノム解析に基づくコイ科ウグイ亜科魚類の系統地理．日本魚類学会年会．2011年度日本魚類学会年会．2011年9月29日～10月2日．弘前．  
後藤亮・半澤直人．ゲノム情報を用いた汎用的マイクロサテライトマーカーの開発とその利用．2011年度日本魚類学会年会．2011年9月29日～10月2日．弘前．  
後藤亮太・河内正行・荒木康男・後藤亮・白熊拓也・上遠野拓也・桂和彦・半澤直人．2012.ミトコンドリア遺伝子に基づく山形県産イワナ *Salvelinus leucomaenis* の遺伝的集団構造．日本動物学会東北支部大会．2012年7月21日．山形．  
千葉悟・渋川浩一・向井貴彦・半澤直人．ジュズカケハゼ種群の分布．2012年度日本魚類学会年会．2012年9月22日．下関．  
大井章豊・安藤元一・小川博・佐々木剛．遺伝的多様性を指標とした河川改修による魚類地域集団への影響の評価．2012年度日本魚類学会年会．2012年9月22日．下関．  
Imoto, J, Ito-Sekimoto, A, Sekimoto H, Shibata K, Takahama M, Sasaki T, Tamate HB and Hanzawa, N. 2013. Population structure of *Tribolodon nakamurai* inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analysis. Symposium on Systematics and Diversity of Fishes. 2013年7月6日．東京．  
後藤亮・半澤直人．2013．比較ゲノムによる相同的マイクロサテライト座位の同定および進化的考察．第14回日本進化学会大会．2013年8月29日．つくば．  
後藤亮・半澤直人．2013．比較ゲノムによる汎用的マイクロサテライトマーカーの開発．日本動物学会第84回大会．2013年9月26日．岡山．  
井元順一・伊藤関本綾・柴田清孝・佐々木剛・玉手英利・半澤直人．2013．ミトコンドリアおよびマイクロサテライトマーカーに基づくウケクチウグイ *Tribolodon nakamurai* とその近縁種の集団解析．2013年度日本魚類学会年会．2013年10月4日．宮崎．  
大井章豊・住倉英孝・勝呂尚之・半澤直人・安藤元一・小川博・佐々木剛．2013．相模川水系と金目川水系におけるアブラハヤの集団構造とその攪乱の可能性．2013年度日本魚類学会年会．2013年10月4日．宮崎．

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/html/632\\_ja.html](http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/html/632_ja.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

半澤 直人 (HANZAWA, Naoto)  
山形大学・理学部・教授  
研究者番号：40292411

### (2)研究分担者

佐々木 剛 (SASAKI, Takeshi)  
東京農業大学・農学部・准教授  
研究者番号：00581844

### (3)研究分担者

千葉 悟 (CHIBA, Satoru)  
独立行政法人国立科学博物館・分子生物多様性研究センター・特定非常勤研究員  
研究者番号：80599431